

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 15/62, A61K 38/17, C07K 16/18, G01N 33/68, C12Q 1/68, C12N 15/86 // 15/11	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> WO 98/21327  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 22 mai 1998 (22.05.98)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/01775  <b>(22) Date de dépôt international:</b> 8 novembre 1996 (08.11.96)  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> MERKEN, Luc [FR/FR]; 14, avenue de Mainville, F-94100 Saint Maur (FR). FOURNIER, Alain [FR/FR]; 28, avenue Roger Salengro, F-92000 Châtenay Malabry (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> PEPTIDES CAPABLE OF INHIBITING THE ENDOCYTOSIS OF THE APP AND CORRESPONDING NUCLEOTIDE SEQUENCES  <b>(54) Titre:</b> PEPTIDES CAPABLES D'INHIBER L'ENDOCYTOSE DE L'APP ET SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CORRESPONDANTES  <b>(57) Abstract</b>  The invention concerns novel peptide and nucleotide sequences, and their pharmaceutical use. More particularly, it concerns novel peptides capable of inhibiting at least partially the phenomenon of APP endocytosis by intervening at the level of the interaction of the FE65 protein with the cytoplasmic region of the APP.  <b>(57) Abrégé</b>  La présente invention concerne de nouvelles séquences peptidiques et nucléotidiques, et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux peptides capable d'inhiber au moins partiellement le phénomène d'endocytose de l'APP en interférant au niveau de l'interaction de la protéine FE65 avec la région cytoplasmique de l'APP.		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PEPTIDES CAPABLES D'INHIBER L'ENDOCYTOSE DE L'APP ET  
SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CORRESPONDANTES

La présente invention concerne de nouvelles séquences peptidiques et nucléotidiques, et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux peptides capables d'inhiber au moins partiellement le phénomène d'endocytose de l'APP.

Le peptide  $\beta$  amyloïde, le constituant majeur de la plaque amyloïde, est un peptide d'environ 40 acides aminés de 4kDa, issu du clivage de l'APP (Précurseur du Peptide Amyloïde). Il s'accumule de façon importante dans le cerveau, non seulement dans la maladie d'Alzheimer mais aussi dans le syndrome de Down plus communément appelé trisomie 21.

L'APP est une protéine glycosylée de 100 à 140kDa, possédant plusieurs domaines dont une région transmembranaire, un domaine extracellulaire et un domaine cytoplasmique. La région de la molécule plus spécifiquement concernée par l'expression du peptide  $\beta$  amyloïde chevauche en partie le domaine transmembranaire et s'étend d'autre part au sein du domaine extracellulaire. Trois formes majoritaires de l'APP, résultant d'un épissage alternatif, ont été caractérisées. Le gène de l'APP est localisé sur le chromosome 21 et des mutations y ont été identifiées dans 3 à 5% des patients atteints des formes familiales de la maladie d'Alzheimer.

Le rôle physiologique de l'APP n'est, à ce jour, pas complètement élucidé ; toutefois, on pense qu'il est impliqué dans le contact synaptique, agit à titre de facteur de régulation de croissance, et est neuroprotectif.

Des données récentes de la littérature ont montré le rôle important de l'endocytose de l'APP pour la production du peptide  $\beta$  amyloïde, et ont permis d'identifier des éléments de séquence, au sein de la région cytoplasmique, utilisés comme signaux d'endocytose. C'est ainsi que des cellules transfectées avec une construction d'ADNc délétée du domaine C terminal cytosolique de l'APP, permettent uniquement la production de la forme soluble de l'APP et ne produisent pas le peptide  $\beta$  amyloïde. Toutefois, *in vivo*, on ne connaît pas encore la nature précise des événements responsables de l'activation de l'endocytose de l'APP ni de la transduction des signaux qui lui sont associés.

L'élucidation du rôle exact de ces signaux d'endocytose dans les cellules, de leur mode de fonctionnement et de leurs caractéristiques constitue donc un enjeu majeur pour la compréhension et l'approche thérapeutique de la maladie d'Alzheimer et plus généralement des maladies neurodégénératives.

- 5           La présente invention résulte de la mise en évidence par la demanderesse que la protéine FE65 ne constitue pas uniquement un activateur transcriptionnel dans le cerveau mais qu'elle interagit également au niveau de la région cytoplasmique de l'APP en intervenant dans la modulation de l'endocytose de l'APP.

- 10           La présente invention résulte plus particulièrement de l'identification et de la caractérisation de régions particulières (dites régions effectrices) de la protéine FE65, impliquées dans la transduction des signaux d'activation de l'endocytose de l'APP. La mise en évidence de l'existence de telles régions permet d'envisager la préparation de nouveaux peptides utilisables pharmaceutiquement.

- 15           Au sens de la présente invention, la dénomination protéine FE65 couvre la protéine en soit ainsi que toutes ses formes homologues. Par forme homologue on entend désigner toute protéine équivalente à la protéine considérée, d'origine cellulaire diverse et notamment issue de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De telles séquences homologues peuvent être  
20           obtenues par des expériences d'hybridation. Au sens de l'invention, il suffit qu'une séquence de ce type présente un pourcentage d'identité significatif pour conduire à un comportement physiologique assimilable à celui de la protéine FE 65 tel que revendiqué.

- 25           Un premier objet de l'invention concerne donc des peptides capables d'interférer au moins partiellement au niveau de l'interaction de la protéine FE65, ou de l'une de ses formes homologues, avec la région cytoplasmique de l'APP.

- 30           Cette interférence d'un peptide selon l'invention peut se manifester sous différents aspects. Le peptide revendiqué peut ralentir, inhiber ou stimuler au moins partiellement l'interaction entre la protéine FE65 ou l'une de ses formes homologues avec la région cytoplasmique de l'APP. De tels peptides sont préférentiellement des peptides capables d'antagoniser au moins partiellement cette interaction.

Selon un mode particulier de l'invention, les peptides sont capables de se lier au niveau du domaine d'interaction entre la protéine FE65 ou l'une de ses formes homologues et la région cytoplasmique de l'APP.

5 Plus préférentiellement, les peptides de l'invention comprennent tout ou partie de la séquence peptidique codant pour la protéine FE65 présentée en SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou un de ses dérivés.

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute séquence différant de la séquence considérée en raison d'une dégénérescence du code génétique, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou chimique, ainsi  
10 que toute séquence hybridant avec ces séquences ou des fragments de celles-ci et conservant la capacité d'interagir au niveau de l'interaction entre la protéine FE65, ou l'un de ses homologues, et la région cytoplasmique de l'APP. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. Le terme dérivé  
15 comprend également les séquences homologues à la séquence considérée, issues d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De telles séquences homologues peuvent être obtenues par des expériences d'hybridation. Les hybridations peuvent être réalisées à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde la séquence  
20 native ou un fragment de celle-ci, dans des conditions variables d'hybridation (Maniatis et al., Cf techniques générales de biologie moléculaire).

De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter leur efficacité thérapeutique ou de réduire leurs effets secondaires, ou celui de leur conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques  
25 et/ou biologiques.

En tant que peptide dérivé de la protéine FE65 et des formes homologues, on peut citer notamment tout peptide capable d'interagir avec la région cytoplasmique de l'APP, mais portant une région effectrice rendue non fonctionnelle. De tels peptides peuvent être obtenus par délétion, mutation ou disruption de cette région effectrice sur  
30 la protéine FE65 et des formes homologues. De telles modifications peuvent être effectuées par exemple par mutagenèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels. Lorsqu'un dérivé tel que défini ci-dessus est réalisé, son activité d'inhibiteur partiel de la fixation de la protéine FE65 et des formes homologues sur son

site de fixation sur l'APP peut être mise en évidence. Toute technique connue de l'homme de l'art peut bien évidemment être utilisée à cet effet.

Il peut également s'agir de fragments des séquences indiquées ci-dessus. De tels fragments peuvent être générés de différentes façons. En particulier, ils peuvent être synthétisés par voie chimique, sur la base des séquences données dans la présente demande, en utilisant les synthétiseurs peptidiques connus de l'homme du métier. Ils peuvent également être synthétisés par voie génétique, par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique codant pour le peptide recherché. Dans ce cas, la séquence nucléotidique peut être préparée chimiquement en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides, sur la base de la séquence peptidique donnée dans la présente demande et du code génétique. La séquence nucléotidique peut également être préparée à partir des séquences données dans la présente demande, par coupures enzymatiques, ligature, clonage, etc, selon les techniques connues de l'homme du métier, ou par criblage de banques d'ADN avec des sondes élaborées à partir de ces séquences.

Par ailleurs, les peptides de l'invention à savoir capables de ralentir ou d'inhiber au moins partiellement l'interaction entre la protéine FE65 et des formes homologues et la région cytoplasmique de l'APP peuvent également être des peptides ayant une séquence correspondant au site d'interaction de la protéine FE65 et des formes homologues sur la région cytoplasmique de l'APP.

D'autres peptides selon l'invention sont les peptides capables d'entrer en compétition avec les peptides définis ci-dessus pour l'interaction avec leur cible cellulaire. De tels peptides peuvent être synthétisés notamment sur la base de la séquence du peptide considéré, et leur capacité à entrer en compétition avec les peptides définis ci-dessus peut être déterminée.

Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragments d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un peptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier, ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un peptide de l'invention, prélèvement du sang, et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art.

Plus préférentiellement, les anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention présentent la capacité d'inhiber au moins partiellement l'interaction des peptides

revendiqués avec la région cytoplasmique de l'APP. Ils peuvent ainsi être utilisés pour moduler l'endocytose de l'APP.

Par ailleurs, ces anticorps peuvent également être utilisés pour détecter et/ou doser l'expression ou la surexpression de l'APP dans des échantillons biologiques, et de ce fait, pour renseigner sur son état d'activation.

L'invention fournit également des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables pharmaceutiquement. Il est en effet possible, à partir des motifs protéiques actifs décrits dans la présente demande, de réaliser des molécules inhibitrices de la voie de signalisation dépendante de la protéine FE65 non exclusivement peptidiques et compatibles avec une utilisation pharmaceutique.

La présente invention a également pour objet toute séquence nucléotidique codant pour un peptide selon l'invention. Il peut s'agir en particulier d'une séquence comprenant tout ou partie de la séquence présentée en SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou une de leurs dérivés. Par séquence dérivée, on entend au sens de la présente invention toute séquence hybridant avec la séquence présentée en SEQ ID N°1 ou en SEQ ID N°2 ou avec un fragment de celles-ci et codant pour un peptide selon l'invention, ainsi que les séquences résultant de ces dernières par dégénérescence du code génétique. Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues soit par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique), soit par synthèse chimique, soit par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

De telles séquences nucléotidiques peuvent être utilisées pour la production des peptides de l'invention. La présente demande concerne ainsi un procédé de préparation d'un tel peptide selon lequel on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon l'invention, dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le peptide produit. Dans ce cas, la partie codant pour ledit peptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, sequence "leader" de sécrétion, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication

autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à réplication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

5 Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des peptides de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant  
10 de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent également servir à  
15 la réalisation d'oligonucléotides antisens ou d'antisens génétiques utilisables comme agents pharmaceutiques. Les séquences antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaire du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant sa traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les séquences antisens capables d'inhiber au moins partiellement  
20 l'interaction des protéines FE65 sur la région cytoplasmique de l'APP. De telles séquences peuvent être constituées par tout ou partie des séquences nucléiques définies ci-avant. Il s'agit généralement de séquences ou de fragments de séquences complémentaires de séquences codant pour des peptides interagissant avec la région cytoplasmique de l'APP. De tels oligonucléotides peuvent être obtenus par  
25 fragmentation, etc, ou par synthèse chimique.

Les séquences revendiquées peuvent être utilisées dans le cadre de thérapies géniques, pour le transfert et l'expression *in vivo* de séquences antisens ou de peptides capables de moduler l'interaction des protéines FE65 avec la région cytoplasmique de l'APP. A cet égard, les séquences peuvent être incorporées dans des vecteurs viraux  
30 ou non viraux, permettant leur administration *in vivo* (Médecine et Sciences 7 (1991) 705). A titre de vecteurs viraux conformes à l'invention on peut tout particulièrement citer les vecteurs de type adénovirus, rétrovirus, virus adéno-associé ou virus de l'herpès. La présente demande a également pour objet des virus recombinants défectifs comprenant une séquence nucléique hétérologue codant pour un polypeptide selon  
35 l'invention.



L'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant, utilisables dans le cadre d'une thérapie génique. De telles sondes peuvent être utilisées *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection de l'expression ou

5 surexpression de l'APP, ou encore pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des peptides tels que définis précédemment, à partir d'autres sources cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines.

10 Les sondes de l'invention comportent généralement au moins 10 bases, et elles peuvent par exemple comporter jusqu'à l'intégralité d'une des séquences précitées ou de leur brin complémentaire. Préférentiellement, ces sondes sont, préalablement à leur utilisation, marquées. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent être employées (marquage radioactif, enzymatique, etc).

15 L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un peptide tel que défini ci-avant.

Elle a aussi pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps et/ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-avant, ainsi que toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif

20 au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-avant.

Par ailleurs, elle a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps et séquence nucléotidique définis ci-avant sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées

25 pour moduler l'activation des protéines APP et de ce fait pour moduler son endocytose et la production de peptides  $\beta$  amyloïde. Plus particulièrement, ces compositions pharmaceutiques sont destinées à moduler l'interaction entre les protéines FE65 et la région cytoplasmique de l'APP. Plus préférentiellement, ces compositions sont destinées à ralentir ou inhiber au moins partiellement l'interaction des protéines FE65

30 avec la région cytoplasmique de l'APP. Il s'agit plus préférentiellement de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21.

L'invention a encore pour objet l'utilisation des molécules décrites ci-avant pour moduler l'activation de l'endocytose de l'APP ou le type de maladies

neurodégénératives. En particulier, l'invention concerne l'utilisation de ces molécules pour inhiber au moins partiellement l'activation de l'endocytose de l'APP.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

#### Légendes des figures :

Figure 1: Représentation du vecteur pGAL4DB-CAPP

Figure 2: Représentation d'ADNs plasmidiques sur gels obtenus selon l'exemple 3.

Figure 3: Comparaison de fragments nucléotidiques de FE65 d'origines diverses

### 15 MATERIELS ET TECHNIQUES MIS EN OEUVRE

#### 1) Les souches de levures utilisées sont:

La souche YCM du genre *S.cerevisiae* (*MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *canr*, *gal4-542*, *gal80-538*, *URA3::GAL1/10-lacZ*, *LYS2::GAL1/10-HIS3*) a été utilisée comme outil de criblage de la banque de fusion de cerveau par le système deux hybrides.

La souche L40 du genre *S.cerevisiae* (*Mata*, *his3D200*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ade2*, *LYS2:: (lexAop)4-HIS3*, *URA3:: (lexAop)8-LacZ*, *GAL4*) a été utilisée pour vérifier les interactions protéine-protéine quand l'un des partenaires protéiques est fusionné à la protéine LexA. Cette dernière est capable de reconnaître l'élément de réponse LexA contrôlant l'expression des gènes rapporteurs *LacZ* et *His3*.

Elles ont été cultivées sur les milieux de culture suivants:

30 Milieu YPD complet: -Extrait de levures (10g/l) (Difco)  
-Bactopeptone (20g/l) (Difco)  
-Glucose (20g/l) (Merck)

Ce milieu a été rendu solide par addition de 20g/l d'agar (Difco).

Milieu YNB minimum:- Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés) (6,7g/l) (Difco)  
- Glucose (20g/l) (Merck)

Ce milieu peut être rendu solide par addition de 20g/l d'agar (Difco).

- 5 Pour permettre la croissance des levures auxotrophes sur ce milieu, il est nécessaire d'y ajouter les acides aminés ou les bases azotées, pour lesquelles elles sont dépendantes à 50mg/ml. 100 µg/ml d'ampicilline sont ajoutés au milieu afin d'éviter les contaminations bactériennes.

2) La souche de bactérie utilisée est :

- 10 La souche TG1 d'*Escherichia coli* de génotype supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB), F'[tra D36 pro A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15]. Elle a été employée comme moyen d'amplification et d'isolement de plasmides recombinants utilisés.

Elle a été cultivée sur

- Milieu LB:  
15 -NaCl (5g/l) (Difco)  
-Bactotryptone (10g/l) (Difco)  
-Extrait de levure (5g/l) (Difco)

Ce milieu peut être rendu solide par addition de 20g/l d'agar (Difco).

- 20 L'ampicilline a été utilisée à 100µg/ml, cet antibiotique sert à sélectionner les bactéries ayant reçu les plasmides portant comme marqueur le gène de résistance à cet antibiotique.

3) Les plasmides mis en oeuvre sont:

- 25 Le vecteur pGBT10, (Clontech), un plasmide navette de 5,4kb qui possède une origine répllication bactérienne et de levure lui permettant de se répliquer à haut nombre de copies chez ces deux micro-organismes. Ce plasmide contient un site multiple de clonage situé en aval de la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et en amont d'un terminateur pour former une protéine de fusion. Il contient également le gène TRP1 de *S. cerevisiae* qui permet de compléter les levures de génotype *trp1* afin de les sélectionner sur un milieu minimum ne contenant pas de

tryptophane. Ce vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline qui permet de sélectionner les bactéries le possédant sur un milieu contenant de l'ampicilline.

- 5 Le vecteur pGAD10, fourni par Clontech et qui permet l'expression chez la levure de protéines de fusion entre le domaine transactivateur de GAL4 et une protéine codée par l'ADNc provenant d'une banque de cerveau, inséré au niveau d'un site EcoRI.

Le vecteur pLex9 (pBTM116) (Bartel et al D.A Hartley Ed, Oxford University press page 153) de 5kb homologue au pGBT10 qui contient un site multiple de clonage situé en aval de la séquence codant pour le répresseur bactérien LexA et en amont d'un terminateur pour former une protéine de fusion.

- 10 4) les oligonucléotides de synthèse employés sont:

CAA GTC GAC CTA GTT CTG CAT CTG CTC (SEQ ID N°3)

CAA GAA TTC AAG AAA CAG TAC ACA TCC (SEQ ID N°4)

Oligonucléotides qui ont permis d'obtenir le fragment PCR correspondant au CAPP avec les sites EcoRI et Sall.

- 15 Les oligonucléotides sont synthétisés sur l'appareil Applied System ABI 394-08. Ils sont décrochés de la matrice de synthèse par de l'ammoniac et précipités deux fois par 10 volumes de n-butanol puis repris dans de l'eau. La quantification est effectuée par mesure de la densité optique (1DO correspond à 30µg/ml).

#### 5) Préparation des ADN plasmidiques.

- 20 Les grandes quantités d'ADN sont préparées en utilisant le Kit de préparation rapide d'ADN de Proméga.

- Les petites quantités d'ADN sont préparées de la manière suivante: les bactéries contenant le plasmide sont cultivées pendant au moins 4 heures dans 2ml de milieu LB dans un shaker à agitation. Elles sont ensuite centrifugées pendant 2 minutes à 14000  
25 rpm dans des tubes Ependorf, puis le culot est remis en suspension dans 100µl de la solution I (50mM de glucose, 25mM de tampon Tris HCl pH8, 10mM EDTA pH8), lysées par 200µl de la solution II (0.2M de NaOH, 1% de SDS). La solution de lyse est ensuite neutralisée par 150µl de la solution III (3M d'acétate de potassium, 11.5% (v/v) d'acide acétique glacial). Après agitation des tubes jusqu'à obtenir un précipité  
30 floconneux, 150µl d'un mélange de phénol/Chloroforme (50% de phénol et 50% de chloroforme saturés en eau) sont ajoutés, et l'ensemble est agité 30 secondes. La

- phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée après centrifugation pendant 2 minutes à 14000 rpm. L'ADN est ensuite précipité par addition de 0,5 volume d'isopropanol puis centrifugé 5 minutes à 14000 rpm et séché à l'air pour enfin être repris dans 20µl de TE RNase (solution de Tris-HCl 10mM et d'EDTA 1mM avec 50µg/ml de RNase).

#### 6) Amplification enzymatique d'ADN ou PCR (Polymerase Chain Reaction).

- Les réactions de PCR sont effectuées dans un volume final de 100µl en présence de la matrice d'ADN, de dNTP (0,2mM), de tampon PCR (Tris-HCL pH 8,5 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, KCl 5 mM, gélatine 0,01%), de 0,5 µg de chacun des oligonucléotides et de 2,5 UI d'Ampli Taq DNA polymérase (Perkin Elmer) avec ou sans formamide (5%). Le mélange est recouvert de 2 gouttes d'huile de paraffine pour limiter l'évaporation de l'échantillon. L'appareil utilisé est le "Crocodile II" d'Appligene.
- Nous avons utilisé une température de dénaturation de la matrice de 90°C, une température d'hybridation des oligonucléotides à la matrice inférieure de 5 à 10 degrés à la température de séparation des oligonucléotides et une température d'élongation par l'enzyme à 72°C.

#### 7) Les ligatures.

- Toutes les réactions de ligation sont effectuées à +14°C pendant une nuit dans un volume final de 10 µl en présence de 100 à 200 ng de vecteur, 0,5 à 2 µg d'insert, 40 UI d'enzyme T4 DNA ligase (Biolabs) et un tampon de ligation (Tris-HCl 50 mM pH 7,8; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; DTT 10 mM; ATP 1 mM). Le témoin négatif est constitué par la ligation du vecteur en l'absence d'insert.

**8) La tranformation des bactéries par un plasmide est effectuée selon le protocole suivant:**

La totalité du volume de ligation (10 $\mu$ l) est utilisée pour transformer les bactéries TG1 rendues compétentes par la méthode de Chung et al, ( PNAS,1988 86, 2172-2175).

- 5 Les bactéries TG1 sont mises en culture dans un milieu LB liquide pendant quelques heures dans une étuve à agitation à 37°C, jusqu'à obtenir une DO de 0,6 à 600nm. Le milieu est ensuite centrifugé à 6000 rpm pendant 10 mn. Les bactéries sont rendues compétentes en reprenant le culot bactérien avec un volume de TSB (milieu LB + 100 g/l de PEG 4000, 5% de DMSO, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>) correspondant
- 10 à 1/10 du volume du milieu de la culture initiale. Après incubation à 4°C pendant 30 à 60 minutes, 200 $\mu$ l de bactéries sont mises au contact des produits de ligation pendant 15 minutes sur la glace. Après addition de 200 $\mu$ l de LB, les bactéries sont incubées 30 mn à 37°C puis étalées sur un milieu LB + ampicilline.

**9) Les séparation et extraction des ADN sont effectuées comme suit:**

- 15 La séparation des ADN est réalisée en fonction de leur taille par électrophorèse. Pour ce faire; différents gels sont utilisés en fonction de la taille des fragments à séparer:
- gels de polyacrylamides précoulés (Novex) à 6%, 10% et 20% pour la séparation des petits fragments d'ADN (75 à 500pb)
  - gel d'agarose à 1% (Gibco BRL) dans un tampon TBE (Tris base 90mM; Borate 90mM; EDTA 2mM) pour la séparation de grands fragments d'ADN
- 20 (supérieurs à 500pdb)
- gel d'agarose NuSieve à 2% (FMC Bioproducts) dans un tampon TBE pour la séparation de petits fragments (inférieurs à 500 pdb).
- Toute migration sur gel d'agarose ou sur gel de polyacrylamide est réalisée dans un
- 25 tampon TBE et en présence d'un marqueur de poids moléculaire (1Kb ladder, Gibco BRL). L'ADN est mélangé avec 1/10 du volume du bleu de dépôt (200g/l de Ficoll, 0,5g/l de bleu de bromophénol, 50mM d'EDTA) avant d'être déposé sur gel. Après migration à 100 Volts et coloration au bromure d'éthidium (concentration 0.5 $\mu$ g/ml de gel), les bandes sont visualisées sous la lampe à UV.
- 30 L'extraction de l'ADN de la bande d'un gel d'agarose est réalisée par électroélution comme suit: Le morceau de gel contenant le fragment d'ADN est découpé au scalpel et mis dans un boudin de dialyse fermé par deux pinces et contenant de 100 à 500 $\mu$ l de

- TBE. L'ensemble est mis dans une cuve à électrophorèse où il subit un champ électrique de 100 Volts. L'ADN, après être sorti du gel, est ensuite purifié par deux extractions au phénol/chloroforme suivies de deux extractions au chloroforme, puis précipité en présence d'acétate de sodium 0,3M et de 2,5 volume d'éthanol absolu.
- 5 Après centrifugation (5 mn à 14000 rpm) le culot d'ADN est séché puis repris dans 20µl l'eau.

#### 10) Séquençage fluorescent des ADN plasmidiques.

- Le séquençage est fait suivant la méthode de Sanger en utilisant 4
- 10 didéoxyribonucléotides possédant un marqueur fluorescent différent. L'incorporation de l'un de ces didéoxyribonucléotides produit un arrêt dans la réplication par la Taq polymérase de l'ADN à séquençer. Cette réaction donnera des fragments d'ADN de tailles différentes, tous terminés en 3' par un des 4 didéoxyribonucléotides.
- Un µg d'un plasmide et 4 picomoles d'un primer sont ajoutés à 9,5µl d'un "prémix"
- 15 fourni par Applied Biosystems sous le nom de Prism<sup>®</sup>. Le volume final doit être de 20µl pour effectuer une PCR pendant 25 cycles se décomposant en une étape de dénaturation à 96°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation à 50°C pendant 15 secondes et une étape d'élongation à 60°C pendant 4 minutes.
- Les fragments d'ADN, obtenus après amplification, sont purifiés sur colonne
- 20 d'exclusion (Chromaspin-30 de Clontech); et sont ensuite séchés au Speed Vac. L'ensemble est repris par 5µl d'un mélange formé de 24µl d'EDTA (50mM) et 120µl de formamide désionisée. Après dénaturation à 96°C pendant 3 minutes, 3 à 5µl sont déposés sur un gel d'électrophorèse. Les différents fragments d'ADN sont séparés suivant leur taille et vont passer successivement devant un lecteur laser de l'Appareil
- 25 370 DNA sequencer (Applied Biosystems) où les différentes fluorescences vont être détectées.

#### 11) Préparation de plasmides de la banque de cerveau (Clontech®).

- La banque de fusion d'ADNc de cerveau est vendue sous forme de bactéries. Ces dernières contiennent un plasmide pGAD10 renfermant un insert correspondant à un
- 30 ADNc de cerveau humain. Les ADNc de cette banque sont constitués grâce à la technique des oligodT et la technique des oligonucléotides dégénérés qui permet

d'avoir les parties 5' des ARNm qui sont difficiles à obtenir par la première technique. Ces cDNA sont clonés dans le vecteur pGAD10 au niveau du site EcoRI.

Après vérification du titre de la banque, 2 $\mu$ l de bactéries de la banque de fusion de cerveau, mises au préalable dans 8 ml de LB, sont étalées de façon non confluyente sur un milieu solide afin de garder la représentativité de cette banque. Nous avons ainsi  
5 étalé 16 boîtes de 770 cm<sup>2</sup> contenant un milieu LB+ampicilline. Les colonies apparues sont reprises pour chacune des boîtes avec 30ml de LB+ampicilline liquide. Les suspensions obtenues sont ensuite mises dans un Erlen et mises à incuber dans un shaker à 37°C pendant 3 heures. L'ADN est ensuite extrait de ces souches par la  
10 technique de la Maxiprep. La concentration en ADN sera déterminée à 260nm.

#### 12) Transformation de la levure par un plasmide.

Les levures préalablement cultivées dans 100ml de milieu liquide sont récoltées après centrifugation à 3000 rpm pendant 3 minutes et mises en suspension dans 1ml d'eau  
15 stérile. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 3 minutes le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 ml d'eau stérile puis centrifugé à nouveau. Cette opération est répétée une nouvelle fois afin d'éliminer toute trace du milieu de culture. Les levures sont ensuite reprises par 1 ml de la solution I de transformation (LiAc 0.1M, Tris-HCl  
20 pH 7,5 10mM, EDTA 1mM). puis centrifugées à 3000 rpm pendant 3 minutes. Le culot cellulaire est repris à nouveau dans 1 ml de la solution I de transformation. 50 $\mu$ l de cette suspension de levures sont mis en présence de 50 $\mu$ g d'ADN de sperme de saumon et de 1 à 5  $\mu$ g d'ADN plasmidique. 300 $\mu$ l d'une solution II de transformation (LiAc 0.1M, Tris-HCl pH 7,5 10mM, EDTA 1mM dans du PEG<sub>4000</sub> 40%) sont ensuite  
25 ajoutés, puis l'ensemble est mis à incuber à 28°C pendant 30 minutes. Un choc thermique est ensuite appliqué sur le mélange de transformation dans un bain-marie à 40°C pendant 15 minutes puis l'ensemble est centrifugé à 15000 rpm pendant 1 mn afin de récolter le culot cellulaire. Ce culot est repris dans 200 $\mu$ l d'eau puis étalé sur un milieu minimum gélosé ne contenant pas les acides aminés correspondant aux marqueurs apportés par le plasmide transformant. Les levures sont ensuite mises à  
30 cultiver pendant 72 heures à 28°C.

Dans le cas particulier de la transformation de la levure par la banque d'ADNc de cerveau, on procède comme suit:



La levure utilisée contient le plasmide pGAL4DB-CAPP codant pour la partie C-terminale de l'APP fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4. Elle est cultivée dans 250ml de milieu minimum YNB+His+Lys+Ad+Leu à 28°C sous agitation jusqu'à une densité de  $10^7$  cellules/ml. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3000rpm pendant 10 minutes et reprises dans 250ml d'eau. Après une nouvelle centrifugation le culot cellulaire est repris dans 100ml d'eau et à nouveau centrifugé. Le culot est alors repris dans 10ml de la solution I de transformation et incubé pendant 1 heure à 28°C sous agitation. Après centrifugation les cellules sont à nouveau reprises dans 2,5 ml de la solution I de transformation, de 100 µl de la banque d'ADNc de cerveau et de 20 ml de la solution II de transformation, puis incubées pendant 1 heure à 28°C sous agitation. Un choc thermique est effectué sur ce mélange de transformation à 42°C pendant 20 minutes. Une centrifugation (3000 rpm pendant 5mn) est répétée 3 fois de suite, en reprenant à chaque fois le culot avec 10 ml d'eau stérile. La troisième fois le culot est repris avec 2,5 ml de PBS. Ainsi le PEG toxique pour les cellules a été éliminé. 2,4 ml de cette suspension sont utilisés pour ensemencer 250 ml de milieu minimum contenant les acides aminés His, Lys, Ad et cultivés durant une nuit dans un shaker à 28°C. Les 100 µl de cette suspension restants servent à vérifier l'efficacité de la transformation; pour cela des dilutions de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  de cette suspension ont été réalisées et étalées sur un milieu minimum contenant les acides aminés His, Lys, Ad. Après culture à 28°C durant 2 jours les colonies obtenues ont été comptées et le taux de transformation est déterminé en utilisant la formule : "nombre de colonies x facteur de dilution". La culture de nuit est centrifugée (3000 rpm pendant 5 mn) et lavée à l'eau stérile deux fois de suite. Le culot est ensuite repris dans 2,5 ml d'eau. 2,4 ml, dont le volume est amené à 10ml dans de l'eau stérile, sont utilisés pour ensemencer 10 boîtes de 435 cm<sup>2</sup> contenant un milieu YNB+Lys+Ad et mis à incuber pendant 3 jours. Les 100 µl restants sont utilisés pour effectuer les mêmes opérations que lors de la détermination du taux de transformation, afin de déterminer le taux d'amplification du nombre de colonies au cours d'une nuit de culture.

30 L'ADN (génomique et plasmidique) est extrait des levures de la manière suivante:.

La valeur d'une anse moyenne d'un clone de levure est mise dans 200µl d'une solution TELT (Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris pH8 10mM, EDTA 1mM), en présence de 3g de billes de verre de 450 µm de diamètre et de 200µl de phénol/chloroforme. Ce mélange est vortexé pendant 15 minutes, puis centrifugé

pendant 2 minutes à 14000 rpm. Le surnageant est collecté sans prélever la galette protéique et l'ADN contenu dans cette phase est précipité avec 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation pendant 2 minutes à 14000 rpm, le culot d'ADN est séché et repris dans 20 $\mu$ l de TERNase. Cette solution d'ADN, qui correspond à un  
5 mélange d'ADN génomique et plasmidique, sert directement à transformer des bactéries. Seul l'ADN plasmidique est capable de se répliquer dans les bactéries et peut être analysé par la technique de miniprep.

### 13) Test d'activité de la $\beta$ galactosidase.

10 Une feuille de nitrocellulose est préalablement déposée sur la boîte de Pétri contenant les clones de levures individualisés. Grâce au phénomène d'adsorption on obtiendra une image fidèle de l'emplacement des clones. Cette feuille est ensuite plongée dans de l'azote liquide pendant 30 secondes afin de faire éclater les levures et de libérer ainsi l'activité  $\beta$ galactosidase. Après décongelation, la feuille de nitrocellulose est déposée,  
15 colonies vers le haut, dans une autre boîte de Pétri contenant un papier Whatman préalablement imbibé de 1,5ml de solution PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40mM, KCl 10mM,  $\text{MgSO}_4$  1mM, pH7) et de 10 à 30 $\mu$ l de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactoside) à 50mg/ml de N,N-diméthylformamide. La boîte est ensuite placée dans une étuve à 37°C couvercle fermé pour éviter le dessèchement. Le temps  
20 d'apparition de la couleur bleue peut être très variable, de quelques minutes à plusieurs heures. Ce test doit toujours se faire en présence d'un témoin positif dont l'interaction est connue et vire rapidement au bleu.

### 25 **EXEMPLE 1: Construction d'un vecteur permettant l'expression d'une protéine de fusion entre la partie C-terminale du précurseur du peptide amyloïde (CAPP) et le domaine de liaison à l'ADN de GAL4**

Le criblage d'une banque utilisant le système double hybride nécessite que la région C-terminale de l'APP (CAPP) soit fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de la protéine transactivatrice GAL4. L'expression de cette protéine de fusion est réalisée  
30 grâce au vecteur pGBT10 (cf matériels et méthodes), dans lequel nous avons introduit,

dans le même cadre de lecture que la séquence correspondant au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (GAL4DB), la séquence codant pour le CAPP figurant dans la séquence présentée en SEQ ID N°1.

- Le fragment d'ADN de 138 pb correspondant aux 46 derniers acides aminés de l'APP a été obtenu par PCR à partir des oligonucléotides (SEQ ID N°3 et N°4) qui nous ont également permis d'introduire les sites EcoRI et SalI aux extrémités de la séquence. Le fragment de PCR a été introduit entre les sites EcoRI et SalI du multisite de clonage du plasmide pGBT10 en aval de la séquence correspondant au GAL4DB pour donner le vecteur pGAL4DB-CAPP (fig.2).
- 10 La construction a été vérifiée par séquençage de l'ADN. Cette vérification nous a permis de montrer que ce fragment ne présentait pas de mutations générées au cours de la réaction de PCR et qu'il était fusionné dans la même phase ouverte de lecture que celle du fragment correspondant au GAL4DB.

## 15 **EXEMPLE 2: CRIBLAGE DE LA BANQUE DE FUSION DE CERVEAU.**

- Le criblage d'une banque de fusion permet d'identifier des clones produisant des protéines fusionnées au domaine transactivateur de GAL4, pouvant interagir avec notre protéine d'intérêt. Cette interaction permet de reconstituer un transactivateur qui va alors être capable d'induire l'expression des gènes rapporteurs His3 et LacZ dans la souche YCM.
- 20

Pour effectuer ce criblage nous avons choisi une banque de fusion réalisée à partir d'ADNc provenant de cerveau humain. Comme cette banque nous a été fournie sous forme de bactéries, l'ADN plasmidique de la banque a tout d'abord été purifié.

### 2.1) Préparation de l'ADN plasmidique d'une banque de fusion.

- 25 L'ADN plasmidique de la banque d'ADNc de cerveau a été extrait suivant le protocole Clontech® (voir matériels et méthodes, § 11). Lors de cette préparation il était important de préserver la représentativité de la banque, c'est à dire, conserver le nombre de plasmides indépendants qui la constitue et qui sont au nombre de  $1,2 \cdot 10^6$  plasmides.

criblage double hybride. Pour pouvoir en obtenir en grande quantité, cet isolement nécessite au préalable une transformation d'E.coli par un extrait d'ADN des souches de levures positives. Comme le plasmide de la banque contenu dans cet extrait est un plasmide navette levure/E.coli il pourra facilement se répliquer chez la bactérie. Afin d'éviter d'isoler le plasmide GAL4 DB - CAPP qui est lui aussi présent dans la levure nous avons travaillé sur des souches qui en sont dépourvues.

Les ADN plasmidiques des colonies bactériennes obtenues après transformation par des extraits d'ADN de levures ont été analysées par digestion avec des enzymes de restriction et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose. Nous avons obtenu 3 profils de restriction différents sur les 5 clones analysés (7D, 3E, 9A, 3H, 3G) (fig 2). Ces résultats ont montré que 2 plasmides identiques sont au moins représentés dans 2 clones de levures différents, les clones 7D, ainsi que les clones 3H et 3G. L'ADN du clone 3E est obtenu à partir de souches de phénotype His<sup>+</sup> et  $\beta$ GAL<sup>+</sup>.

#### 15 **EXEMPLE 4: DETERMINATION DE LA SEQUENCE DES INSERTS DES PLASMIDES IDENTIFIES.**

Le séquençage a été réalisé à partir de l'oligonucléotide (SEQ ID N°5) complémentaire de la région de GAL4TA à proximité du site d'insertion de la banque de cDNA de cerveau, à 52 pdb du site EcoRI.

20 La comparaison des 3 séquences avec les séquences contenues dans les banques de données GENBank et EMBL (European Molecular Biology Lab) a montré que les séquences des ADNc qui étaient dans les plasmides issus des souches 9A et 3H présentent 87% d'homologie au niveau nucléique avec le gène murin codant pour la protéine FE65, elles sont représentées en SEQ ID N°2, et que la séquence du plasmide issu de la souche 7D présente 60% d'homologie avec ce même gène ( voir figure 3).

25 L'analyse de la séquence des plasmides issus des souches 9A et 3H indique que ceux-ci contiennent deux régions chevauchantes correspondant à un même ARNm.

Afin de nous préserver de la perte de plasmides de la banque au cours de cette préparation, le lot d'ADN plasmidique que nous avons constitué a été obtenu à partir d'un nombre de colonies bactériennes isolées correspondant à un peu plus de deux fois la représentativité de la banque soit  $4.10^6$  colonies.

5    2.2) Transformation par banque de cerveau et sélection par le test d'activité  $\beta$ galactosidase.

Lors du criblage il est nécessaire de préserver la probabilité que chaque plasmide indépendant de la banque de fusion soit présent dans au moins une levure en même temps que le plasmide GAL4DB-CAPP. Pour préserver cette probabilité il est  
10 important d'avoir une bonne efficacité de transformation de la levure. Pour cela nous avons choisi un protocole de transformation de la levure donnant une efficacité de  $10^5$  cellules transformées par  $\mu$ g d'ADN. De plus comme la cotransformation de la levure par deux plasmides différents réduit cette efficacité, nous avons préféré utiliser une levure préalablement transformée par le plasmide pGAL4DB-CAPP. Cette souche  
15 YCM-CAPP de phénotype His-, Lys-, Leu- a été transformée par 100 $\mu$ g d'ADN plasmidique de la banque de fusion. Cette quantité d'ADN nous a permis d'obtenir après estimation (voir matériels et méthodes)  $10^7$  cellules transformées, ce qui correspond à un nombre légèrement supérieur au nombre de plasmides indépendants que constitue la banque. D'après ce résultat nous pouvons penser que la quasi totalité  
20 des plasmides de la banque a servi à transformer les levures. La sélection des cellules transformées, capables de reconstituer un transactivateur GAL4 fonctionnel, a été faite sur un milieu YNB+Lys+Ad.

A l'issue de cette sélection 1000 clones avec un phénotype His+ ont été obtenus. Sur ces transformants un test d'activité  $\beta$ galactosidase a été effectué afin de valider par  
25 l'expression de l'autre gène rapporteur, *LacZ*, ce nombre de clones obtenus. 68 des 1000 clones obtenus présentaient le double phénotype His+,  $\beta$ Gal+ pouvant correspondre à une interaction protéine-protéine.

EXEMPLE 3: ISOLEMENT DES PLASMIDES DE LA BANQUE

30 Afin d'identifier les protéines pouvant interagir avec le CAPP, nous avons extrait les plasmides de la banque de fusion contenus dans les levures sélectionnées lors du

## LISTE DE SEQUENCES

## 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

- 5 (1) DEPOSANT:  
 (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.  
 (B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron  
 (C) VILLE: ANTONY  
 10 (E) PAYS: FRANCE  
 (F) CODE POSTAL: 92165  
 (G) TELEPHONE: 40.91.69.22  
 (H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.96
- 15 (11) TITRE DE L' INVENTION:  
 (111) NOMBRE DE SEQUENCES: 5
- 20 (1v) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:  
 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## 25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR:1500  
 30 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (11) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

## 40 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR:1275  
 (B) TYPE: nucléotide  
 45 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (11) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

55	CGG GAG GAG TCC CAG CTC ACC TGG ACA GGT TTT GCT CAT GGA GAA GGC	48
	Arg Glu Glu Ser Gln Leu Thr Trp Thr Gly Phe Ala His Gly Glu Gly	
	1 5 10 15	
	TTT GAG GAT GGA GAA TTT TGG AAG GAT GAA CCC AGT GAT GAG GCC CCA	96

## 21

	Phe	Glu	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Lys	Asp	Glu	Pro	Ser	Asp	Glu	Ala	Pro	
				20					25					30			
5	ATG	GAG	CTG	GGA	CTG	AAG	GAA	CCT	GAG	GAG	GGG	ACG	TTG	ACC	TTC	CCA	144
	Met	Glu	Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Pro	Glu	Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	
			35					40				45					
10	GCT	CAG	AGC	CTC	AGC	CCA	GAG	CCG	TTG	CCC	CAA	GAG	GAG	GAG	AAG	CTT	192
	Ala	Gln	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	
		50					55				60						
15	CCC	CCA	CGG	AAT	ACC	AAC	CCA	GGG	ATC	AAG	TGT	TTC	GCC	GTG	CGC	TCC	240
	Pro	Pro	Arg	Asn	Thr	Asn	Pro	Gly	Ile	Lys	Cys	Phe	Ala	Val	Arg	Ser	
	65					70				75					80		
20	CTA	GGC	TGG	GTA	GAG	ATG	ACC	GAG	GAG	GAG	CTG	GCC	CCT	GGA	CGC	AGC	288
	Leu	Gly	Trp	Val	Glu	Met	Thr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro	Gly	Arg	Ser	
				85				90						95			
25	AGT	GTG	GCA	GTC	AAC	AAT	TGC	ATC	CGT	CAG	CTC	TCT	TAC	CAC	AAA	AAC	336
	Ser	Val	Ala	Val	Asn	Asn	Cys	Ile	Arg	Gln	Leu	Ser	Tyr	His	Lys	Asn	
				100				105						110			
30	AAC	CTG	CAT	GAC	CCC	ATG	TCT	GGG	GGC	TGG	GGG	GAA	GGA	AAG	GAT	CTG	384
	Asn	Leu	His	Asp	Pro	Met	Ser	Gly	Gly	Trp	Gly	Glu	Gly	Lys	Asp	Leu	
			115					120					125				
35	CTA	CTG	CAG	CTG	GAG	GAT	GAG	ACA	CTA	AAG	CTA	GTG	GAG	CCA	CAG	AGC	432
	Leu	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Val	Glu	Pro	Gln	Ser	
		130					135					140					
40	CAG	GCA	CTG	CTG	CAC	GCC	CAA	CCC	ATC	ATC	AGC	ATC	CGC	GTG	TGG	GGC	480
	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Ala	Gln	Pro	Ile	Ile	Ser	Ile	Arg	Val	Trp	Gly	
	145					150					155				160		
45	GTC	GGG	CGG	GAC	AGT	GGA	AGA	GAG	AGG	GAC	TTT	GCC	TAC	GTA	GCT	CGT	528
	Val	Gly	Arg	Asp	Ser	Gly	Arg	Glu	Arg	Asp	Phe	Ala	Tyr	Val	Ala	Arg	
				165				170						175			
50	GAT	AAG	CTG	ACC	CAG	ATG	CTC	AAG	TGC	CAC	GTG	TTT	CGC	TGT	GAG	GCA	576
	Asp	Lys	Leu	Thr	Gln	Met	Leu	Lys	Cys	His	Val	Phe	Arg	Cys	Glu	Ala	
				180				185						190			
55	CCT	GCC	AAG	AAC	ATC	GCC	ACC	AGC	CTG	CAT	GAG	ATC	TGC	TCT	AAG	ATC	624
	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ala	Thr	Ser	Leu	His	Glu	Ile	Cys	Ser	Lys	Ile	
			195					200					205				
60	ATG	GCC	GAA	CGG	GGT	AAT	GCC	CGC	TGC	TTG	GTA	AAT	GGA	CTC	TCC	CTG	672
	Met	Ala	Glu	Arg	Gly	Asn	Ala	Arg	Cys	Leu	Val	Asn	Gly	Leu	Ser	Leu	
		210					215					220					
65	GAC	CAC	TCT	AAA	CTT	GTG	GAT	GTC	CCT	TTC	CAA	GTG	GAA	TTC	CCA	GCG	720
	Asp	His	Ser	Lys	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Phe	Gln	Val	Glu	Phe	Pro	Ala	
		225				230					235				240		
70	CCT	AAG	AAT	GAG	TTG	GTC	CAG	AAG	TTC	CAA	GTC	TAT	TAC	CTG	GGG	AAT	768
	Pro	Lys	Asn	Glu	Leu	Val	Gln	Lys	Phe	Gln	Val	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Asn	
				245						250					255		

22

	GTA CCT GTT GCT AAA CCT GTT GGG GTA GAT GTG ATT AAT GGG GCC CTC	816
	Val Pro Val Ala Lys Pro Val Gly Val Asp Val Ile Asn Gly Ala Leu	
	260 265 270	
5	GAG TCA GTC CTG TCC TCC AGC AGC CGT GAA CAA TGG ACC CCA AGT CAT	864
	Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Ser Arg Glu Gln Trp Thr Pro Ser His	
	275 280 285	
10	GTC AGT GTG GCC CCT GCT ACC CTC ACC ATC TTG CAC CAG CAG ACA GAG	912
	Val Ser Val Ala Pro Ala Thr Leu Thr Ile Leu His Gln Gln Thr Glu	
	290 295 300	
15	GCA GTG CTG GGA GAG TGT CGG GTG CGT TTC CTC TCC TTC CTG GCC GTG	960
	Ala Val Leu Gly Glu Cys Arg Val Arg Phe Leu Ser Phe Leu Ala Val	
	305 310 315 320	
20	GGC AGA GAT GTC CAC ACG TTT GCA TTC ATC ATG GCT GCC GGC CCA GCC	1008
	Gly Arg Asp Val His Thr Phe Ala Phe Ile Met Ala Ala Gly Pro Ala	
	325 330 335	
25	TCA GAG GCT GTG CAG GCT GCG TGC ATG CTT CGC TAC CAG AAG TGT CTG	1104
	Ser Glu Ala Val Gln Ala Ala Cys Met Leu Arg Tyr Gln Lys Cys Leu	
	355 360 365	
30	GAT GCC CGT TCC CAG GCC TCC ACC TCC TGC CTC CCA GCA CCC CCT GCT	1152
	Asp Ala Arg Ser Gln Ala Ser Thr Ser Cys Leu Pro Ala Pro Pro Ala	
	370 375 380	
35	GAG TCT GTG GCA CGG GGT GTA GGG TGG ACT GTC CGC AGG GGT GTT CAG	1200
	Glu Ser Val Ala Arg Gly Val Gly Trp Thr Val Arg Arg Gly Val Gln	
	385 390 395 400	
40	TCG CTG TGG GGC TCC CTG AAG CCC AAA CGG GTG GGG GGC CAT ACC CCA	1248
	Ser Leu Trp Gly Ser Leu Lys Pro Lys Arg Val Gly Gly His Thr Pro	
	405 410 415	
45	TGA AGA AGC CCC ACC TTC CCT CCA CCT	1275
	* Arg Ser Pro Thr Phe Pro Pro Pro	
	420 425	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 50 (A) LONGUEUR: 27  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

55

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:



23

CAAGTCGACC TAGTTCTGCA TCTGCTC

27

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR
- (B) TYPE: nucléotide
- 10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(11) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

(x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CAAGAATTCA AGAAACAGTA CACATCC

20 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:23
- (B) TYPE: nucléotide
- 25 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(11) TYPE DE MOLECULE: ADNc

30

(x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTATTCGATG ATGAAGATAC CCC

23

## REVENDECATIONS

1. Peptide caractérisé en ce qu'il est capable d'interférer au niveau de l'interaction de la protéine FE65 ou l'une de ses formes homologues avec la région cytoplasmique de l'APP.
- 5        2. Peptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'interférence se traduit par un ralentissement, une inhibition ou une stimulation de ladite interaction.
3. Peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il est capable de se lier au niveau du domaine d'interaction entre la protéine FE65 ou l'une de ses formes homologues et la région cytoplasmique de l'APP.
- 10       4. Peptide selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou d'un dérivé de celles-ci.
5. Peptide capable d'entrer en compétition avec un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 au niveau du domaine d'interaction entre la protéine FE65 ou l'une de ses formes homologues et la région cytoplasmique de  
15 l'APP.
6. Composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable de moduler l'interaction entre la protéine FE65 et la région cytoplasmique de l'APP obtenu par reproduction des motifs actifs des peptides selon les revendications 1 à 5 par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.
- 20       7. Séquence nucléotidique codant pour un peptide tel que défini en revendication 1 à 5.
8. Séquence nucléotidique selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence comprenant tout ou partie de la SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celles-ci.
- 25       9. Séquence selon la revendication 7 ou 8 introduite dans un vecteur viral ou non viral.
10. Oligonucléotide antisens d'une séquence selon la revendication 7 ou 8.

11. Anticorps ou fragment d'anticorps caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un peptide selon l'une des revendications 1 à 5.
12. Sonde nucléotidique capable de s'hybrider avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 ou avec l'ARNm correspondant.
- 5        13. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un peptide selon l'une des revendications 1 à 6 ou un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 11 ou une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 7 à 9.
- 10       14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur viral ou non viral recombinant dans lequel est incorporée une séquence nucléotidique selon la revendication 7 ou 8.
- 15       15. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral choisi parmi les rétrovirus et les adénovirus.
- 15       16. Composition pharmaceutique selon une des revendications 13 à 15 destinée à moduler l'interaction entre la protéine FE65 et la région cytoplasmique de l'APP.
- 20       17. Composition pharmaceutique selon la revendication 16 ou 17 destinée à interférer au niveau de l'interaction entre la protéine FE65 et la région cytoplasmique de l'APP.
- 20       18. Composition pharmaceutique selon la revendication 16 destinée au traitement des maladies neurodégénératives.
- 25       19. Utilisation d'un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 11 et/ou d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 7 ou 8 pour le typage de maladies neurodégénératives.
- 25       20. Procédé de préparation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon la revendication 7 ou 8 dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le peptide produit.

21. Virus recombinant défectif comprenant une séquence nucléique hétérologue codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.

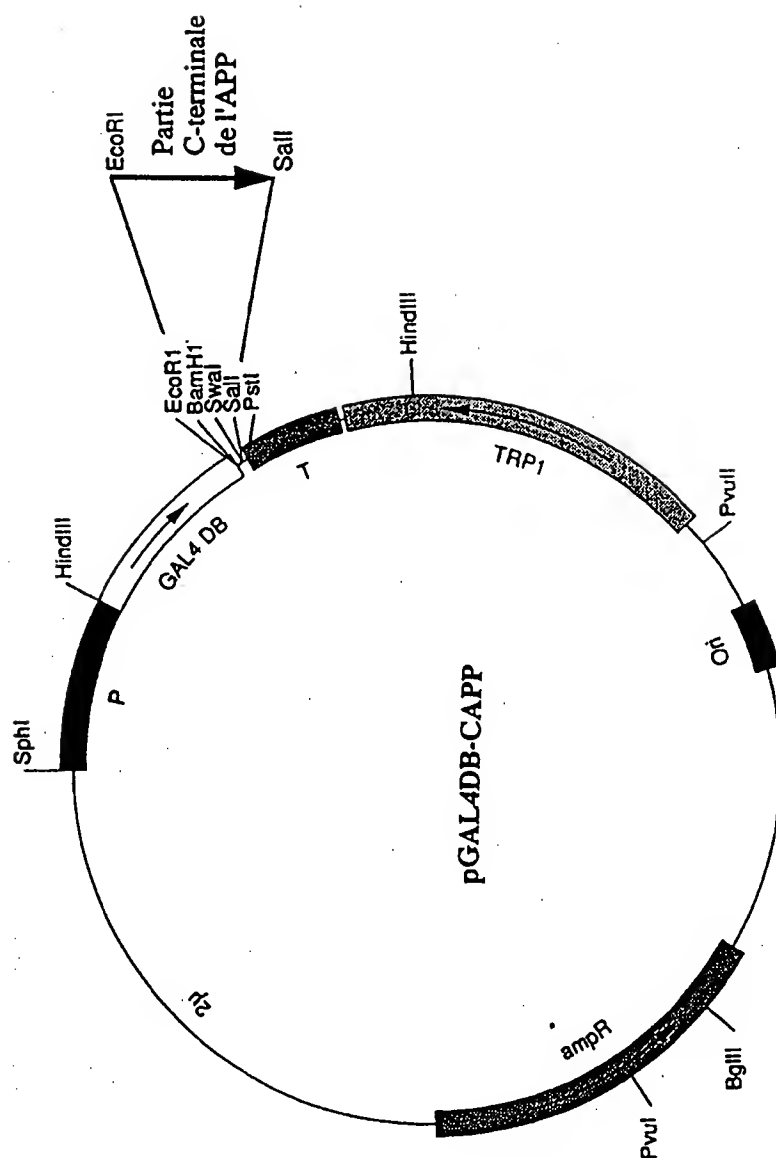


Figure 1

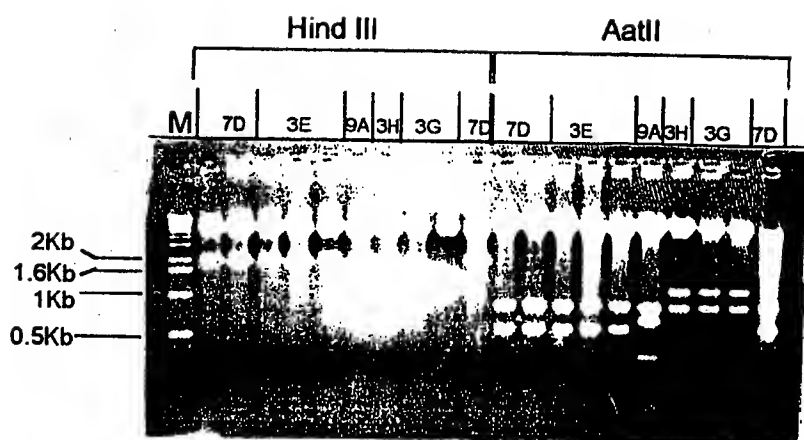


Figure 2

FE65 rat	LSPEPLPQEEEEKLPPRNTNPGIKCF <del>A</del> VRS L
Sequence issue souches 9A, 3H	LSPE'PV'PQEEENLPQRNANPGIKCF <del>A</del> VRS L * * * * * * * * * * * * * *
Séquence issue souche 7D	LRNAPH <del>P</del> DDDDSSCSINS <del>D</del> PEAKCW <del>A</del> VRS L
FE65 rat	GWVEMTEEEELAPGRSSVA <sup>*</sup> VNNCIRQLSYHK <sup>*</sup> N
Séquence issue souches 9A, 3H	GWVEMTEEEELAPGRSSVA <sup>*</sup> VNNCIRQLSYHK <sup>*</sup> N * * * * * * * * * * * * * *
Séquence issue souche 7D	GWVEMAEEDLAPGKSSVA <sup>*</sup> ANN <sup>*</sup> CIRQLSYCK <sup>*</sup> N

Figure 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01775

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/62 A61K38/17 C07K16/18  
G01N33/68 C12Q1/68 C12N15/86 //C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 19692 A (GEN HOSPITAL CORP) 1 September 1994  see the whole document ---	1-3,7,9, 13-15, 20,21
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (1996 NOV) 16 (11) 6229-41., XP000676581 BORG J P ET AL: "The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein." see the whole document --- -/--	1-3,5,7, 9,20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 1997

Date of mailing of the international search report

18.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01775

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1995 DEC 29) 270 (52) 30853-6, XP002007462 FIORE, F. ET AL.: "The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer 's amyloid precursor protein." see the whole document ---	1-5,7-9
A	HUMAN MOLECULAR GENETICS, (1996 OCT) 5 (10) 1589-98., XP002033791 BRESSLER, S. ET AL.: "cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein." see the whole document ---	1-21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (1991 OCT 11) 19 (19) 5269-74., XP002002141 DUILIO, A. ET AL.: "A rat brain mRNA encoding a transcriptional activator homologous to the DNA binding domain of retroviral integrases." cited in the application ---	
E	FR 2 740 454 A (RHONE POULENC RORER SA) 30 April 1997 see the whole document ---	1-21
T	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 MAR 7) 272 (10) 6399-405., XP002033792 ZAMBRANO, N. ET AL.: "Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer 's beta-amyloid precursor proteins." see the whole document -----	1-3,5,7,9,20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01775

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9419692 A	01-09-94	US 5578451 A	26-11-96
FR 2740454 A	30-04-97	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No <b>PCT/FR 96/01775</b>		
<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6    C12N15/12    C07K14/47    C12N15/62    A61K38/17    C07K16/18 G01N33/68    C12Q1/68    C12N15/86    //C12N15/11		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6    C12N    C07K    A61K    C12Q    G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94 19692 A (GEN HOSPITAL CORP) 1 Septembre 1994  voir le document en entier ---	1-3,7,9, 13-15, 20,21
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (1996 NOV) 16 (11) 6229-41., XP000676581 BORG J P ET AL: "The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein." voir le document en entier --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-3,5,7, 9,20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&amp;* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">26 Juin 1997</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">18.07.97</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Andres, S</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deme internationale No  
PCT/FR 96/01775

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1995 DEC 29) 270 (52) 30853-6, XP002007462 FIORE, F. ET AL.: "The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer 's amyloid precursor protein." voir le document en entier ---	1-5,7-9
A	HUMAN MOLECULAR GENETICS, (1996 OCT) 5 (10) 1589-98., XP002033791 BRESSLER, S. ET AL.: "cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein." voir le document en entier ---	1-21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (1991 OCT 11) 19 (19) 5269-74., XP002002141 DUILIO, A. ET AL.: "A rat brain mRNA encoding a transcriptional activator homologous to the DNA binding domain of retroviral integrases." cité dans la demande ---	
E	FR 2 740 454 A (RHONE POULENC RORER SA) 30 Avril 1997 voir le document en entier ---	1-21
T	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 MAR 7) 272 (10) 6399-405., XP002033792 ZAMBRANO, N. ET AL.: "Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer 's beta-amyloid precursor proteins." voir le document en entier -----	1-3,5,7, 9,20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 96/01775

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9419692 A	01-09-94	US 5578451 A	26-11-96
FR 2740454 A	30-04-97	AUCUN	